Journal of Plant Protection
Vol. 34, No. 4, Winter 2021, P. 401-411

نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۴، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۹، ص. ۴۱۱-۴۰۱

مقاله پژوهشی

شناسایی و بررسی خصوصیات مولکولی جدایه‌های ویروس کوتولگی زرد پیاز (*Onion yellow dwarf virus*) در برخی از مناطق کشت سیر در ایران

آزاده انتظاری[1]- محسن مهرور[2]*- محمد زکی عقل[3]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۲/۲۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۵/۱۲

چکیده

ویروس کوتولگی زرد پیاز (*Onion yellow dwarf virus*, OYDV)، یک پوتی ویروس مهم و خسارت‌زا در سیر بوده که باعث ظهور رگه‌های کلروتیک خفیف تا زرد روشن در برگ‌های آلوده می‌شود. به دنبال گسترش علائم، کاهش رشد و اندازه قپه‌های سیر نیز رخ می‌دهد، اما به طور کلی اصلی‌ترین علامت آلودگی OYDV هم در سیر و هم در پیاز وقوع کوتولگی در میزبان آلوده است. به منظور شناسایی و تعیین برخی از خصوصیات مولکولی و بیولوژیکی OYDV در کشور، در سال‌های ۱۳۹۷-۱۳۹۶ تعداد ۶۸ نمونه برگی مشکوک به آلودگی از مزارع سیر در استان‌های خراسان رضوی، مازندران، لرستان، کرمان و خوزستان جمع آوری شد. در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با انجام نسخه‌برداری معکوس (Reverse Transcription-PCR, RT-PCR) با استفاده از یک جفت آغازگر دژنره مربوط به ژن CI، قطعه ۷۰۰ جفت بازی در ۵۴ نمونه تکثیر شد. جهت انجام آنالیز ژنومی و تعیین روابط فیلوژنتیکی در جدایه‌های ایرانی، تعداد ۷ نمونه برگی دارای علائم مشخص بیماری به عنوان نماینده از هریک از مناطق نمونه‌برداری انتخاب شدند. این جدایه‌ها پس از همسانه سازی در ناقل pTG19-T، به شرکت ماکروژن کره جنوبی جهت توالی یابی ارسال شدند. مقایسه نتایج توالی‌یابی جدایه‌های ایرانی با سایر جدایه های موجود در بانک ژن، نشان دهنده درصد تشابه نوکلئوتیدی جدایه‌های ایرانی OYDV با یکدیگر و با سایر جدایه‌های موجود در بانک ژن به ترتیب (۹۴/۴۴ - ۷۹/۸۹) و (۹۹/۸۶-۷۵/۰۴) بود. همچنین دندروگرام حاصل از مطالعه تبارزایی بر اساس ژن CI، جدایه‌های ایرانی را در دو گروه مجزا از هم نشان داد. بررسی وقوع نوترکیبی در میان جدایه‌های ایرانی نشان دهنده عدم وجود هر گونه نوترکیبی در این ناحیه از ژن CI بود. لازم به ذکر است این پژوهش اولین گزارش از وجود OYDV در برخی از مناطق عمده کشت سیر در ایران، بر اساس ژن CI ویروسی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: ایران، بررسی فیلوژنتیکی، سیر، ویروس کوتولگی زرد پیاز

مقدمه

جنس گیاهی آلیوم (*Allium* L.) با بیش از ۸۰۰ گونه گیاهی، بزرگترین و مهمترین جنس خانواده Amaryllidaceae می‌باشد که به طور گسترده در سرتاسر جهان پراکنده شده است. تاکنون بالغ بر ۵۰ بیماری از روی گیاهان این جنس گزارش شده که یکی از مهمترین آنها بیماری‌های ویروسی می‌باشد. در میان بیمارگرهای ویروسی شناخته شده چهار گونه وجود دارد که دائماً آلوده کننده گونه های جنس آلیوم بوده، این گونه‌ها شامل : ویروس کوتولگی زرد پیاز *Onion yellow dwarf virus* (OYDV)، ویروس نوار زرد تره فرنگی *Leek yellow stripe virus* (LYSV)، ویروس نهفته عمومی سیر *Garlic common latent virus* (GCLV) و ویروس نهفته موسیر *Shallot latent virus* (SLV) می‌باشند (۱۵). لازم به ذکر است که این گیاهان عموماً توسط یک یا چندین ویروس در هنگام تکثیر رویشی (غیر جنسی) آلوده می‌شوند و به دلیل کاهش شدید بازده محصول و افت کیفیت آن به عنوان مشکلی جدی مورد توجه قرار گرفته‌اند (۹ و ۱۵). در جنس آلیوم گونه‌های زراعی متعددی وجود دارد که یکی از مهمترین آنها گونه گیاهی (Garlic) *Allium sativum* L. یا همان سیر خوراکی می‌باشد که بعد از پیاز رتبه دوم تولید جهانی را در بین گیاهان پیازی به خود اختصاص داده است. با توجه به اهمیت سیر هم در مصارف غذایی و هم دارویی، این گیاه جایگاه ویژه‌ای را در صنعت پزشکی به خود اختصاص داده و در گروه محصولات پر طرفدار جهانی قرار می‌گیرد (۱۳). در ایران، علی‌رغم داشتن پتانسیل زراعی و صنعتی بالا در کشور همچنان با کمبود سیر در بازارهای داخلی روبرو هستیم (۳). دلیل اصلی این اتفاق شیوع

۱، ۲ و ۳- به‌ترتیب دانشجوی دکتری بیماری‌شناسی گیاهی و دانشیاران، گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email: mehrvar@um.ac.ir)
DOI: 10.22067/jpp.v34i4.86685

بالای آلودگی‌های ویروسی در سیر گزارش شده است به‌طوری‌که در برخی از مناطق کشت سیر در ایران وقوع آلودگی ویروسی تا ۱۰۰٪ تخمین زده شده است (۱۶). آلودگی در سیر موجب کاهش شدید بازده محصول و افت کیفیت آن می‌شود. در این گیاه تکثیر غیرجنسی (رویشی) منجر به افزایش آلودگی‌های مخلوط از ویروس‌های مختلف شده، همچنین باعث شده این گیاه به راحتی توسط ویروس‌های مختلفی از طریق روش های گوناگون انتقال آلوده شود (۱۳). اغلب گیاهان سیر کاشته شده در جهان توسط گونه‌های متعدد ویروسی که با نام Garlic virus complex معروف شده‌اند، آلوده می‌شوند اما باید توجه داشت که بالغ بر ۸۸٪ کاهش وزن قپه‌های سیر صرفا توسط پوتی ویروس‌ها گزارش شده است (۶). خانواده پوتی ویریده (*Potyviridae*) بزرگترین خانواده در گروه ویروس‌های گیاهی آر. ان. ای دار تک رشته‌ای مثبت (ssRNA+) می‌باشد که بر اساس نحوه انتقال توسط ناقلین و خصوصیات ژنومی، به دوازده جنس تقسیم‌بندی می‌شود که بزرگترین جنس این خانواده *Potyvirus* می‌باشد (۲۳). اعضای این جنس دارای ذراتی به طول حداقل ۷۰۰ نانومتر بوده که دربرگیرنده ژنوم آر. ان. ای تک رشته‌ای مثبت به اندازه حدود ۱۰ کیلو باز می‌باشد (۷ و ۲۰). ویروس کوتولگی زرد پیاز (OYDV) متعلق به خانواده *Potyviridae* و جنس *Potyvirus* می‌باشد که به عنوان یک گونه بیمارگر گیاهی مهم و اقتصادی شناخته شده و موجب بیماری زایی شدید در پیاز، سیر و سایر گیاهان جنس آلیوم می‌شود (۱۵، ۲۰ و ۲۲). در سال ۱۹۲۹ ملهوس و همکاران با انجام مطالعات گسترده بر روی پیازهای دارای علائم کوتولگی، زرد شدن، پیچیدگی و زیکزاکی شدن برگ‌ها، برای اولین بار وجود بیماری موزائیک در پیاز را گزارش کردند (۸ و ۱۲)، که با تداوم و تکمیل مطالعات خود درسال ۱۹۳۰، عامل این بیماری را ویروس کوتولگی زرد پیاز (*Onion yellow dwarf virus*-OYDV) معرفی نمودند (۸). این ویروس توسط شته های خانواده Aphididae به روش ناپایا منتقل می‌شود. دو گونه *Myzus persicae* و *M. ascalonicus* جزء انتقال دهندگان قوی این ویروس هستند که نقش مهمی در گسترش ویروس دارند (۴، ۱۱، ۱۲، ۱۴، ۱۵ و ۲۲). علائم OYDV در برگ‌های آلوده سیر به صورت ایجاد رگه‌ها یا نوارهای کلروتیک خفیف تا زرد روشن بسته به ایزوله ویروسی و کولتیوار قابل مشاهده است، که به دنبال گسترش علائم، کاهش رشد و اندازه قپه‌ها نیز رخ می‌دهد (۱۷). به طور کلی اصلی ترین علامت آلودگی OYDV وقوع کوتولگی در میزبان آلوده است. لازم به ذکر است که بر اساس یافته‌های گاواندِ و همکاران در سال ۲۰۱۳، هیچ ارتباطی میان رنگ پوست سیر، غلظت ویروس و انتشار بیماری وجود ندارد (۶). جهت شناسایی OYDV همانند سایر ویروس ها می‌توان از روش الکترومیکروسکوپی، روش‌های سرولوژیکی نظیر الایزا و روش‌های مولکولی نظیر RT-PCR استفاده نمود اما باید توجه داشت که بر خلاف سایر جنس‌های ویروسی، روش سرولوژیکی پارامتر مناسبی جهت تمایز ویروس‌ها در میان اعضای جنس پوتی ویروس نیست. به طوریکه برخی از واکنش‌های متقابل سرولوژیکی ممکن است موجب خطا در تفسیر نتایج شود. اما در مقابل با وجود پیشرفت‌های اخیر در روش‌های مولکولی ابزارهای جدیدی برای تشخیص، شناسایی و طبقه‌بندی ویروس‌های آلوده کننده جنس آلیوم فراهم شده که در این بین روش RT-PCR به عنوان یک روش تشخیصی جایگزین، سریع و قابل اعتماد برای OYDV مورد توجه قرار گرفته است (۳، ۱۰، ۱۷ و ۱۹). در سال ۲۰۰۸، OYDV توسط شهرآئین و همکاران برای اولین بار از ایران از مناطق مختلف کشور شامل: تهران، ورامین، رودبار، جیرفت، چالوس، ساری، قزوین و نوشهر و صرفا بر پایه آزمون سرولوژیکی گزارش شد (۱۶). سپس در سال ۲۰۱۰ بقالیان و همکاران این ویروس را از برخی مناطق ایران از روی سیر جداسازی و گزارش کردند (۳). همچنین آنها درخت فیلوژنتیکی ویروس را بر اساس پوشش پروتئینی (CP) آن رسم کردند (۳). در این تحقیق باتوجه به اینکه روش‌های شناسایی مولکولی بر پایه انجام PCR در پوتی ویروس‌ها بر اساس طراحی پرایمرهای دژنره برای نواحی حفاظت شده در ژنوم آنها استوار است و همچنین بر اساس نتایج بدست آمده از مطالعات محققین خصوصا در سال‌های اخیر، که منطقه کدشونده CI را جهت اهداف تاکسونومیکی مناسب تر از CP (که به طور معمول استفاده می شود) معرفی کرده‌اند (۲ و ۷)، تعداد هفت جدایه OYDV جدا شده از مزارع تحت کشت سیر در برخی از مناطق کشور انتخاب و با استفاده ازآنالیز مولکولی ناحیه ژن CI مورد بررسی قرار گرفتند و جایگاه تاکسونومیکی آنها در میان جدایه های OYDV تعیین گردید.

مواد و روش‌ها

منشاء ویروس و شناسایی مولکولی

در پاییز، زمستان و بهار سال‌های ۱۳۹۶ و ۱۳۹۷ پس از بازدید از مزارع سیر در استان‌های خراسان رضوی (مشهد و حومه، تربت حیدریه، گناباد، چناران و فریمان)، مازندران (ساری و بابلسر)، لرستان (الشتر)، کرمان (جیرفت) و خوزستان (شوشتر)، از بین نمونه‌های برگی مشکوک به آلودگی که دارای علائم موزائیک، رگه‌های کلروتیک، بدشکلی و کوتولگی بودند، تعداد ۶۸ نمونه انتخاب شد (شکل ۱). در شرایط آزمایشگاهی، اسید ریبونوکلئیک کل از بافت گیاهی با استفاده از کیت استخراج آر. ان.ای (RNeasy Mini Kit) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده (Qiagen, Germany)، استخراج شد. پس از انجام نانودراپ و تعیین کیفیت نمونه‌های استخراج شده، با استفاده از یک جفت آغازگر دژنره (CI.F/Rev) که براساس توالی حفاظت شده ژن سی آی (Cylindrical Inclusion- CI) ویروس طراحی شده بود (۷) واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase

(Chain Reaction- PCR) انجام شد. بدین صورت که در ابتدا با استفاده از اسید ریبونوکلئیک کل استخراج شده، آغازگر برگشت (CI.Rev) و آنزیم نسخه‌برداری معکوس (Reverse Transcriptase- RT) متعلق به شرکت تاکارا (Takara, Japan)، CDNA سنتز شد. سپس آزمون PCR در حجم ۲۵میکرولیتری و با استفاده از آغازگرهای رفت و برگشت و مسترمیکس شرکت Ampliqon صورت گرفت. جهت انجام این آزمون، ۲ میکرولیتر از cDNA ساخته شده به عنوان الگو، ۱ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت (هریک به غلظت ۱۰ میکرومولار) و ۱۲/۵ میکرولیتر از مخلوط واکنش Taq DNA Polymerase Master Mix Red-Ampliqon با هم ترکیب شدند. چرخه دمایی این آزمون شامل : واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت چهار دقیقه، ۳۵ چرخه متوالی شامل: ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه و در آخر، مرحله گسترش نهایی در مدت زمان ده دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. تمامی محصولات واکنش PCR در ژل آگارز ۱٪ رنگ آمیزی شده با گرین ویور (EcoDye DNA Staining Solution-Mxcell) با استفاده از دستگاه الکتروفورز از هم جدا شدند. سپس باندهای تکثیری مورد نظر در این تحقیق، در ناحیه ۷۰۰ جفت بازی، با استفاده از کیت Qiaquick gel extraction kit متعلق به شرکت کیاژن (Qiagen, Germany) از روی ژل آگارز خالص سازی شدند. قطعه‌ژنی خالص سازی شده مربوط به قسمتی از ژن CI در هر جدایه درون پلاسمید pTG19-T (Vivantis, Malaysia) همسانه سازی شد. پلاسمیدهای نوترکیب به داخل سلول‌های مستعد *Escherichia coli* سویه DH5α تراریخت شدند. شناسایی همسانه‌ها از طریق کلونی پی سی آر (Colony PCR) با استفاده از آغازگرهای عمومی M13 انجام شد. دی. ان. ای پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از کیت Plasmid DNA Isolation Kit (Denazist, Iran) استخراج شدند وجهت تعیین ترادف نوکلئوتیدی به شرکت ماکروژن کره جنوبی (Macrogen Inc., South Korea) ارسال شدند. توالی‌های دریافت شده ابتدا در پایگاه اطلاعاتی NCBI با برنامه BLAST با توالی‌های موجود در بانک ژن مقایسه شدند.

هم ردیف‌سازی چندگانه توالی‌های نوکلئوتیدی، آنالیز فیلوژنتیکی و نوترکیبی

در ابتدا جهت بررسی خصوصیات فیلوژنتیکی جدایه‌های ایرانی OYDV شناسایی شده از نقاط مختلف کشور، هم ردیف‌سازی چندگانه توالی‌های ژنومی میان جدایه‌های ایرانی با سایر جدایه‌های ثبت شده در بانک ژن (NCBI) با استفاده از برنامه DNAMAN v4.02 انجام شد. همچنین جهت تعیین درصد تشابه هم در سطح نوکلئوتیدی و هم آمینواسیدی از نرم‌افزار Clustal Omega استفاده شد. لازم به ذکر است که توالی‌های نوکلئوتیدی با استفاده از نرم‌افزار ORFfinder (Open Reading Frame Finder) به توالی‌های آمینواسیدی ترجمه شدند. جهت تعیین روابط فیلوژنتیکی و مشخص شدن منشا تکاملی جدایه‌های ایرانی، درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار MEGA 6 و به دو روش Maximum-Likelihood (ML) و(Neighbor-Joining (NJ بر اساس ۱۰۰۰ تکرار (Bootstrap) رسم شد. جهت ترسیم ماتریس شباهت بین جدایه‌های ایرانی OYDV در سطح نوکلئوتیدی و آمینواسیدی از نرم‌افزار SDT (v.1.2) و هم ردیف‌سازی توالی‌ها به روش Muscle استفاده شد. همچنین جهت بررسی وقوع و ردیابی مکان‌های احتمالی نوترکیبی در ژنوم هریک از جدایه‌های ایرانی از روش‌های قرار داده شده در نرم افزار RDP4 (v.4.95) شامل: RDP، GENECONV، BOOTSCAN، CHIMERA، SISCAN، MAXCHI، 3SEQ استفاده شد.

انتقال مکانیکی ژنوم بیماری‌زا ویروس به گیاهان میزبان

جهت بررسی بیماری‌زایی ژنوم ویروس، مایه‌زنی مکانیکی گیاهان میزبان شامل: *Allium cepa*، *Chenopodium quinoa* و گونه‌های عاری از آلودگی *Allium sativum* با استفاده از بافر فسفات پتاسیم (۵۰ میلی‌مولار) و با رساندن pH به عدد ۷ در مرحله ۴-۳ برگی انجام شد. گیاهان تلقیح شده جهت ظهور علائم، در گلخانه عاری از حشرات در شرایط دمایی ۲۵-۲۳ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. این گیاهان در مدت زمان ۱۵ تا ۲۸ روز از زمان تلقیح مکانیکی، از نظر علائم آلودگی مورد بررسی قرار گرفتند. نهایتا جهت اثبات بیماری‌زا بودن گیاهان میزبان، از مشاهدات چشمی و همچنین آزمون RT-PCR استفاده شد.

نتایج و بحث

باتوجه به پیشینه پژوهش در مورد ویروس کوتولگی زرد پیاز، تاکنون از برخی کشورهای دنیا گزارش شده اما در ایران بررسی جامعی روی آن صورت نگرفته است. به همین علت جهت بررسی جامع‌تر این ویروس، مطالعات بر روی OYDV در طی فصل‌های پاییز، زمستان و بهار آغاز گردید. بر اساس بررسی‌های مولکولی انجام شده و نتایج به دست آمده در طی سال‌های ۱۳۹۶ و ۱۳۹۷ از مزارع سیر در استان‌های خراسان رضوی، مازندران، لرستان، کرمان و خوزستان از میان ۶۸ نمونه برگی جمع آوری شده، وجود آلودگی در۵۴ نمونه تایید شد. پس از بررسی هریک از نمونه‌های برگی مثبت ارزیابی شده در آزمون زنجیره‌ای پلیمراز و مشاهده قطعه تکثیر شده ۷۰۰ جفت بازی بر روی ژل آگارز، تعداد هفت جدایه مربوط به

شهرهای گلبهار (IR-Kh48)، کدکن (IR-Kh16)، جیرفت (IR-Kh33)، شوشتر (IR-Kh1, IR-Kh2)، ساری (IR-Kh23) و الشتر (IR-Kh54)، که علائم تیپیک آلودگی را بر روی برگ سیر ایجاد کرده بودند، جهت توالی‌یابی و تکمیل مطالعه این ویروس انتخاب و نهایتا توالی ژنومی این هفت جدایه در بانک جهانی ژن ثبت گردید. اگرچه تعداد زیادی از نمونه‌های جمع آوری شده از مناطق مختلف کشور علائم شدید ویروسی را نشان دادند، اما آلودگی تعداد اندکی از نمونه‌ها (۱۴ نمونه) در آزمون زنجیره‌ای پلیمراز تایید نشد. که این امر می‌تواند نتیجه آلودگی میزبان سیر به سایر ویروس‌های آلوده کننده گونه‌های گیاهی آلیوم باشد. یا به عبارت دیگر، ما در میزبان سیر اغلب با کمپلکسی از ویروس‌ها مواجه هستیم که گاها علائم تقریبا مشابهی را بر روی میزبان نشان می‌دهند. همچنین آلودگی توام این ویروس ها موجب وقوع اثر هم افزایی بر روی یکدیگر شده و شدت علائم را افزایش می‌دهد. اما در اکثر موارد دو علامت موزاییک شدید و کوتولگی در بین آنها رایج می‌باشد. با این حال نکته‌ی مهم این است که در میان اعضای کمپلکس ویروسی، OYDV به عنوان بیمارگر غالب با بیماری‌زایی بالا معرفی شده است (۶، ۱۰ و ۲۱). در مطالعات بیولوژیکی انجام شده بر روی OYDV، در فاصله زمانی ده تا چهارده روز از مایه‌زنی سه گیاه محک *Chenopodium quinoa*، *Allium cepa*. و گونه‌های عاری از آلودگی *Allium sativum* در گلخانه، بروز علائم بیماری آغاز و روند پیشرفت آلودگی تا بیست و هشت روز بصورت روزانه ثبت گردید. به منظور اطمینان از آلودگی گیاهان محک، علاوه بر مشاهدات چشمی علائم، آر. ان. ای کل از بافت گیاهی استخراج و آزمون زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از جفت آغازگر دژنره CI انجام شد و باند مورد انتظار ۷۰۰ جفت بازی بر روی ژل آگارز در گیاهان آلوده مشاهده گردید. علائم اولیه در میزبان *C. quinoa* با ظهور لکه‌های کلروتیک آغاز که به تدریج با پیشرفت بیماری بر تعداد لکه‌ها افزوده شد (شکل ۱). ظهور رگه‌های کلروتیک خفیف تا زرد شدن در برگ‌های سیر عاری از آلودگی، پس از گذشت ۱۴-۱۰ روز از زمان مایه‌زنی مشاهده شد که به تدریج با پیشرفت بیماری بدشکلی، کوتولگی و موزاییک شدید نیز در گیاهان آلوده ظاهر شد (شکل ۱). علائم مشاهده شده با مطالعات قبلی هم خوانی داشت (۱، ۱۱ و ۱۵). اما در پیازهای تلقیح شده علائمی از آلودگی بر روی برگ‌ها مشاهده نشد (شکل ۱). که نتیجه حاصل با پژوهش های پیشین مطابقت داشت، به طوریکه OYDV جداشده از سیر به دلیل اختصاصیت بالا میزبانی قادر به آلوده کردن پیاز نیست (۱۱).

در ادامه مطالعه و به منظور انجام آنالیزهای فیلوژنتیکی، در ابتدا هم ردیف‌سازی چندگانه ترادف‌های نوکلئوتیدی و آمینو اسیدی میان جدایه‌های ایرانی OYDV و سایر جدایه‌های ثبت شده در بانک ژن از نقاط مختلف جهان صورت گرفت. نتایج نشان دهنده دامنه درصد تشابه نوکلئوتیدی (۹۴/۴۴ - ۷۹/۸۹) و (۷۵/۰۴-۹۹/۸۶) به ترتیب میان جدایه‌های ایرانی با یکدیگر و با سایر جدایه‌های موجود در بانک ژن بود (جداول ۱ و ۲). در مقایسه نمونه‌های ایرانی با یکدیگر کمترین درصد تشابه (۷۹/۸۹) میان جدایه‌ای از شوشتر (IR-Kh2) با جدایه‌های از ساری (IR-Kh23) و لرستان (IR-Kh54) بود و این در حالی است که بالاترین درصد تشابه (۹۴/۴۴) میان دو جدایه از شوشتر (IR-Kh1, IR-Kh2) مشاهده شد (جدول ۱). همچنین نتایج حاصل از مقایسه جدایه‌های ایرانی با سایر جدایه‌های موجود در بانک ژن، نشان دهنده کمترین درصد تشابه (۷۵/۰۴) میان جدایه شوشتر (IR-Kh2) با جدایه‌هایی از آلمان (AT) و آرژانتین (Se) می‌باشد. اما بالاترین درصد تشابه در سطح نوکلئوتیدی میان جدایه شوشتر (IR-Kh2) با جدایه‌ای از اسپانیا (SG1) به میزان ۹۹/۸۶ قابل مشاهده است (جدول ۲). همچنین نتایج حاصل از هم ردیف‌سازی چندگانه آمینواسیدی میان جدایه‌های ایرانی باهم و با سایر جدایه‌های موجود در بانک ژن به ترتیب نشان دهنده درصد تشابه (۹۹/۵۶- ۹۱/۵۶) و (۱۰۰-۹۰/۲۲) بود.

به منظور تایید توالی‌یابی جدایه‌های ایرانی، هم ردیف‌سازی چندگانه توالی‌های پلی پروتئینی این جدایه‌ها با سایر جدایه‌های OYDV موجود در بانک ژن صورت گرفت و وجود موتیف‌های حفاظت شده در ژن CI بررسی شد. با توجه به نقش هلیکازی این محصول، دمین‌های RNA هلیکازی معروف با نام‌های DECHV، ILVYVSS، SATI، VATNII و ENGVTLD به همراه تعدادی از آمینو اسیدهای حفاظت شده (۵)، در جدایه‌های ایرانی یافت شد (شکل ۲). در نتیجه، مشاهده وجود آمینو اسیدهای حفاظت شده و دمین‌های هلیکازی در توالی آمینواسیدی جدایه‌های ایرانی تأییدی بر توالی‌یابی صحیح جدایه‌ها و قرار گرفتن آنها در جنس *Potyvirus* و گونه OYDV بود.

جهت تعیین روابط فیلوژنتیکی و مشخص نمودن منشا تکاملی آنها، درخت فیلوژنتیکی هفت جدایه ایرانی به همراه یازده جدایه دیگر OYDV موجود در بانک ژن از سایر نقاط دنیا، بر اساس تطابق ترادف نوکلئوتیدی با دو روش Neigbour joining و Maximum likelihood با استفاده از نرم افزار MEGA 6 و براساس ۱۰۰۰ تکرار رسم گردید. نتایج نشان دهنده یکسان بودن توپولوژی دندروگرام رسم شده در دو روش NJ و ML بود. به همین دلیل صرفا دندروگرام رسم شده به روش ML نمایش داده شد (شکل ۳)، که بر اساس آن جدایه های مورد بررسی OYDV در دو گروه اصلی (I, II) قرار می‌گیرند به طوریکه هر گروه خود به دو زیرگروه مجزا تقسیم بندی می‌شود (شکل ۳).

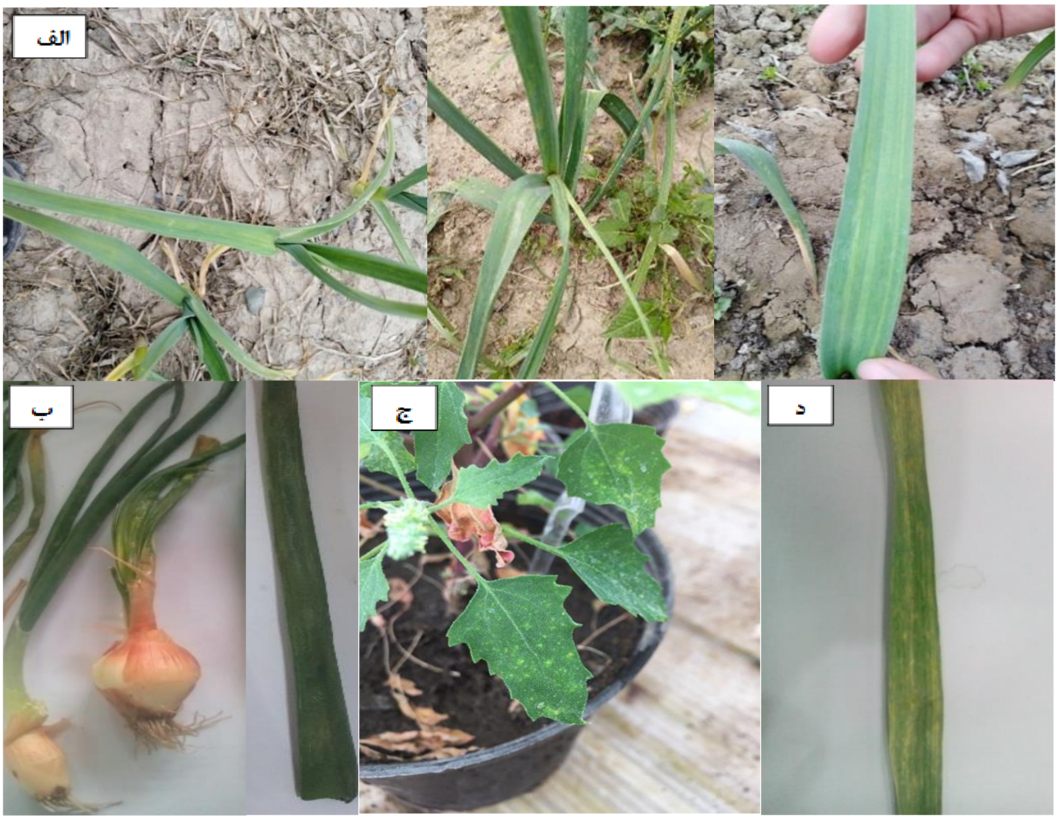
جدول ۱- درصد تشابه توالی نوکلئوتیدی ژن CI میان جدایه‌های ایرانی OYDV جمع آوری شده از نقاط مختلف کشور به صورت جداگانه با یکدیگر

Table 1- Percentage of CI nucleotide identities between Iranian OYDV isolates collected from different parts of the country separately

جدایه‌های ایرانی Iranian isolates	1	2	3	4	5	6	7
1: IR-kh2	100.00	80.60	**94.44**	92.58	83.31	79.89	79.89
2: IR-kh48	80.60	100.00	83.31	84.02	88.16	**94.15**	91.44
3: IR-kh1	**94.44**	83.31	100.00	91.16	84.45	82.74	82.03
4: IR-kh16	**92.58**	84.02	91.16	100.00	85.73	83.02	83.59
5: IR-kh33	83.31	88.16	84.45	85.73	100.00	88.45	**89.87**
6: IR-kh23	79.89	**94.15**	82.74	83.02	88.45	100.00	92.72
7: IR-kh54	79.89	91.44	82.03	83.59	89.87	**92.72**	100.00

بالاترین درصد تشابه میان جدایه های ایرانی در هر ردیف، برای هر جدایه به صورت برجسته نمایش داده شده است.

The highest percentage of identities between Iranian isolates in each row is displayed in bold for each isolate.



شکل ۱- نمونه‌های برگی سیر آلوده به ویروس کوتولگی زرد پیاز (OYDV) با علائم رگه‌های کلروتیک و موزاییک شدید از استان خراسان رضوی (الف). مشاهده علائم ظاهر شده در گیاهان مایه‌زنی شده: عدم ظهور علائم در پیاز (ب)، ظهور لکه‌های کلروتیک در *C. quinoa* (ج) و ظهور رگه های زردرنگ نامنظم و موزاییک شدید در سیرهای مایه‌زنی شده عاری از آلودگی (د)

Figure 1- Leaf samples of garlic infected by *onion yellow dwarf virus* (OYDV) with symptoms of yellow striping and severe mosaic, collected from Razavi Khorasan Province (A). Symptoms of inoculated plants: No symptoms on *A. cepa* (B), chlorotic local lesions on *C. quinoa* leaves (c) and irregular yellow striping and sever mosaic observed in inoculated garlic

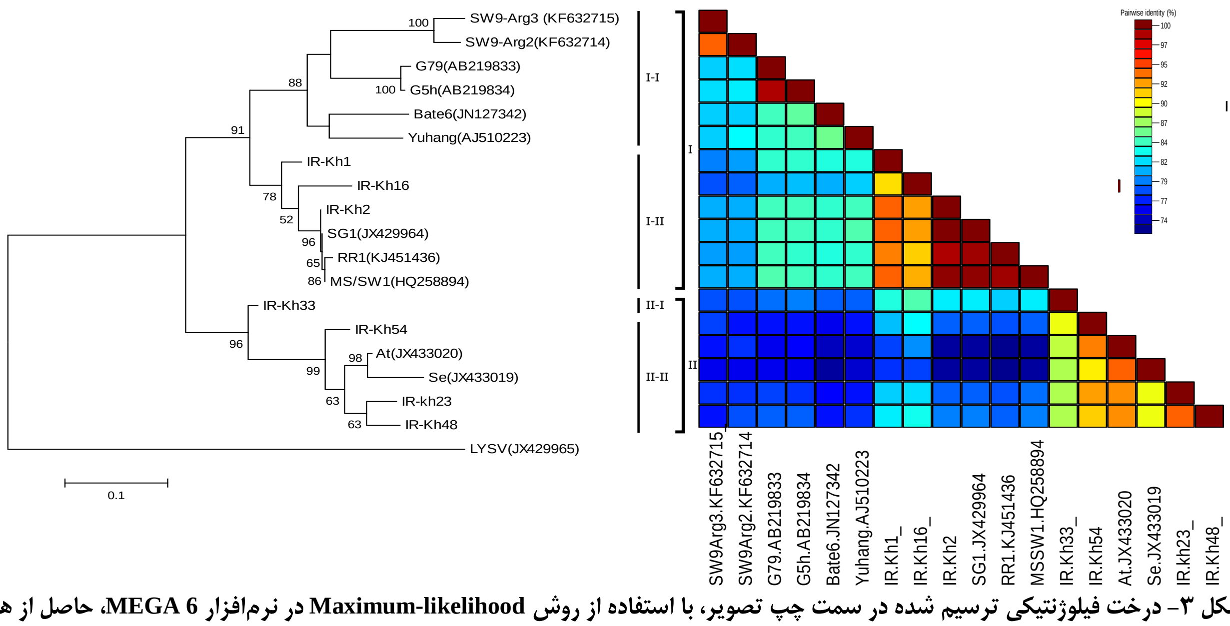
```
IR-Kh33    LHSLANNRDNISKYDYIMIDECHVLDAKAMAFYCLLKDVNYKGKILKTSATIPGRESGFK
IR-Kh54    LHSLANNRDNISKYDYIMIDECHVLDANAMALYCFLKDVNYKGKILKTSATIPGRESGFK
IR-kh23    LHSLANNRDNISKYDYIMIDECHVLDANAMALYCLLKDVNYKGKILKTSATIPGRESGFK
IR-Kh48    LHSLANNRDNISKYDYIMIDECHVLDANAMALYCLLKDVNYKGKILKTSATIPGRESGFK
IR-Kh16    LHSLANNRGNISQYDYIMIDECHVLDANGMALYCLLKDVNYKGKILKTSATIPGRESGFK
IR-Kh1     LHSLANNRGNISQYDYIMIDECHVLDANAMALYCLLKDVNYKGKILKTSATIPGRESGFK
IR-Kh2     LHSLANNRGNIEQYDYIMIDECHVLDANAMALYCLLKDVNYKGKILKTSATIPGRESGFK
                                 I                          II

IR-Kh33    LSTQHDVTLNVEENMTFDAFVQAQGTGSNACVTTRGHNILVYVSSYNEVDTLARKLTEHG
IR-Kh54    FSTQHDVTLNVEENMTFDAFIQAQGTGSNACVTSRGHNILVYVSSYNEVDTLSRKLVEHG
IR-kh23    FSTQHDVTLNVEENMTFDAFVQAQGTGSNACVTTRGHNILVYVSSYNEVDTLSRKLVEHG
IR-Kh48    FSTQHDVTLNVEENMTFDAFVQAQGTGSNACVTTRGHNILVYVSSYNEVDTLSRKLVEHG
IR-Kh16    FSTQHDVTLNVEENLTFDAFIQAQGTGSNACVTSRGDNILVYVSSYNEVDTLSRKLTEHG
IR-Kh1     LSTQHDVTLNIEENLTFDAFIQAQGTGSNACVTTRGDNILVYVSSYNEVDTLARKLVEHG
IR-Kh2     LSTQHDVTLNIEENLTFDAFIQAQGTGSNACVTTRGDNILVYVSSYNEVDTLARKLTEHG
                                                   III

IR-Kh33    HKVTKVDGRTMKLGGTRIETNGSASKKHFIVATNII ENGVTLDID
IR-Kh54    HKVTKVDGRTMKFGGTRIETNGSAVKKHFIVATNII ENGVTLDID
IR-kh23    HKVTKVDGRTMKLGGTRIETNGSAVKKHFIVATNII ENGVTLDID
IR-Kh48    HKVTKVDGRTMKLGGTRIETNGSADKKHFIVATNII ENGVTLDID
IR-Kh16    HKVTKVDGRTMKFGGTRIETSGSASKKHFIVATNII ENGVTLDID
IR-Kh1     HKVTKVDGRTMKLGGTRIETSGSASKKHFIVATNII ENGVTLDID
IR-Kh2     HKVTKVDGRTMKLGGTRIETSGSAVKKHFIVATNII ENGVTLDID
                                           IV        V
```

شکل ۲- هم ردیف‌سازی توالی آمینو اسیدی ژن CI در جدایه‌های ایرانی OYDV. آمینو اسیدهای حفاظت شده به رنگ خاکستری و پنج دمین هلیکازی (I-V) با کشیده شدن خط قرمز در زیر آنها، قابل مشاهده‌اند.

Figure 2- Cylindrical inclusion (CI) protein sequence alignment of Iranian OYDV isolates. Conserved amino acids are colored in gray and the red line was drawn under the five helicase domains (I-V).



شکل ۳- درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده در سمت چپ تصویر، با استفاده از روش Maximum-likelihood در نرم‌افزار MEGA 6، حاصل از هم ردیف‌سازی چندگانه ترادف نوکلئوتیدی ناحیه ژنی CI هفت جدایه ایرانی شناسایی شده از نقاط مختلف کشور به همراه یازده جدایه OYDV ثبت شده در بانک جهانی ژن قابل مشاهده است. اعداد نمایانگر درصد Bootstrap بر اساس ۱۰۰۰ تکرار می‌باشند. LYSV به عنوان عضو برون گروه (Outgroup) انتخاب شد. در سمت راست تصویر، ماتریس شباهت در سطح نوکلئوتیدی با استفاده از نرم‌افزار SDT v.1.2 و هم ردیف‌سازی توالی‌ها به روش MUSCLE ترسیم شد

Figure 3- Maximum-likelihood (ML) phylogenetic tree in MEGA6 software constructed based on multiple CI nucleotide sequence alignments of seven Iranian isolates identified from different parts of the country along with eleven OYDV isolates available in the GenBank. Numbers at each node indicate bootstrap percentages based on 1000 replications. LYSV (JX429965) was used as an outgroup. Two-dimensional nucleotide diversity plot constructed based on SDT MUSCLE alignment

جدول ۲- درصد تشابه نوکلئوتیدی ژن CI میان هفت جدایه ایرانی OYDV از نقاط مختلف کشور با یازده جدایه ثبت شده در بانک جهانی ژن از نقاط مختلف دنیا

Table 2- Percentage of CI nucleotide identities among seven Iranian OYDV isolates from different parts of the country and eleven isolates registered in the GenBank from different parts of the world

جدایه Isolate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1: RR1-KJ451436	100.00	99.29	99.00	98.86	79.89	74.47	82.74	74.47	79.32	85.16	76.46	93.58	91.58	85.02	81.46	81.17	84.45	85.31
2: MS/SW1-HQ258894	99.29	100.00	99.71	99.57	80.46	75.04	83.31	75.04	79.89	85.59	80.03	94.29	92.30	85.45	81.88	81.60	84.88	85.73
3: SG1-JX429964	99.00	99.71	100.00	99.86	80.60	75.04	83.31	75.04	79.89	85.31	79.89	94.29	92.54	85.73	81.74	81.74	85.16	85.45
4: **IR-Kh2**	98.86	99.57	99.86	100.00	80.60	75.04	83.31	75.04	79.89	85.45	79.89	94.44	92.58	85.59	81.74	81.74	85.02	85.59
5: **IR-Kh48**	79.89	80.46	80.60	80.60	100.00	93.01	83.16	90.01	91.44	79.74	94.15	83.31	84.02	78.46	77.89	79.17	77.89	79.74
6: At-Jx433020	74.47	75.04	75.04	75.04	93.01	100.00	88.59	94.44	93.58	77.32	93.30	78.74	80.88	75.89	77.89	78.32	75.61	77.03
7: **IR-Kh33**	82.74	83.31	83.31	83.31	88.16	88.59	100.00	88.45	89.87	80.60	88.45	84.45	85.73	79.74	79.32	79.17	79.60	80.31
8: Se-Jx433019	74.47	75.04	75.04	75.04	90.01	94.44	88.45	100.00	90.58	77.03	89.87	78.32	78.89	75.89	76.89	76.89	74.89	76.75
9: **IR-Kh54**	79.32	79.89	79.89	79.89	91.44	93.54	89.87	90.58	100.00	77.89	92.72	82.03	83.59	77.60	78.74	77.89	76.89	77.89
10: Gsh-AB219834	85.16	85.59	85.31	85.45	79.74	77.32	80.60	77.03	77.89	100.00	78.60	85.16	82.03	85.45	83.02	83.31	86.16	98.72
11: **IR-Kh23**	79.46	80.03	79.89	79.89	94.15	93.30	88.45	89.87	92.72	78.60	100.00	82.74	83.02	77.75	78.60	78.60	77.18	78.74
12: **IR-Kh1**	93.58	94.29	94.29	94.44	83.31	78.74	84.45	78.32	82.03	85.16	82.74	100.00	91.16	84.74	80.74	81.17	84.74	85.02
13: **IR-Kh16**	91.58	92.30	92.58	92.58	84.02	80.88	85.73	78.89	83.59	82.03	83.02	91.16	100.00	82.60	79.17	79.74	81.60	81.88
14: Yuhang-AJ510223	85.02	85.45	85.73	85.59	78.46	75.89	79.74	75.89	77.60	85.45	77.75	84.74	82.60	100.00	82.45	83.59	86.45	85.16
15: SW9-Arg3-KF632715	81.46	81.88	81.74	81.74	77.89	77.89	79.32	76.89	78.74	83.02	78.60	80.74	79.17	82.45	100.00	94.44	82.74	82.60
16: SW9-Arg2-KF632714	81.17	81.60	81.74	81.74	79.17	78.32	79.17	76.89	77.89	83.31	78.60	81.17	79.74	83.59	94.44	100.00	82.74	82.88
17: Bate6-JN127342	84.45	84.88	85.16	85.02	77.89	75.61	79.60	74.89	76.89	8.16	77.18	84.74	81.60	86.45	82.74	82.74	100.00	85.59
18: G79-AB219833	85.31	85.73	85.45	85.59	79.74	77.03	80.31	76.75	77.89	98.72	78.74	85.02	81.88	85.16	82.60	82.88	85.59	100.00

جدایه‌ها برحسب نام جدایه و شماره دسترسی در جدول ذکر شده اند.

جدایه‌های ایرانی در جدول به صورت برجسته جهت تفکیک از سایر جدایه‌های دنیا نمایش داده شده‌اند.

Isolates are listed in the table by isolate name and accession number.

Iranian isolates are highlighted in the table to distinguish them from other isolates in the world.

گـــــروه I شـــــامل جدایـــــه‌هـــــایی از آرژانتـــــین (KF632714/KF632715)، ژاپـــن (AB219833/AB219834)، اسـترالیا (HQ258894/JN127342)، چـین (AJ510223)، اسـپانیا (JX429964)، هند (KJ451436) و ایران می‌باشد. این گروه از نظـر جغرافیایی یک گروه نامتجانس را تشکیل می‌دهد. تمامی ایـن دوازده جدایه واقع در گروه I از میزبان سیر جدا شده‌اند. سه جدایه ایرانی IR-Kh1، IR-Kh2 و IR-Kh16 جدا شده از سیر در گـروه I و در زیـر گـروه I-II در کنـار جدایـه‌هـایی از اسـپانیا (JX429964)، اسـترالیا (HQ258894) و هند (KJ451436) قرار گرفتنـد کـه بیـانگر رابطـه ژنتیکی بالای این جدایه‌ها با یکدیگر می‌باشد. اما گروه II که خود نیز به دو زیر گروه تقسیم‌بندی می‌شود در برگیرنده چهـار جدایـه ایرانـی IR-Kh33، IR-Kh54، IR-Kh23 و IR-Kh48 جدا شـده از سـیر می‌باشد که در ارتباط نزدیـک بـا دو جدایـه آلمـانی (JX433020) و آرژانتینی (JX433019) OYDV جدا شده از میزبـان پیـاز (Onion) می‌باشند. با توجه به اینکـه گـروه II در برگیرنـده جدایـه‌هـایی از دو میزبان سیر و پیاز می‌باشد، جدایی میزبانی با گروه‌بندی فیلوژنتیکی ما هم‌خوانی ندارد. همچنین با توجه به هم گروه شدن برخی از جدایه‌هـا از مناطق مختلف جهان با یکدیگر که انطبـاقی بـا قرابـت جغرافیـایی ندارند، نشان می‌دهد که انتشار گسترده و جهانی OYDV نمـی‌توانـد تنها به وسیله ناقلین شته‌ای صورت گیرد و احتمال نقـش صـادرات و واردات این محصول در جهان از طریق پیاز آن تقویـت مـی‌شـود. در کنار درخت فیلوژنتیکی رسم شده، ماتریس درصد تشابه میـان جدایـه های ایرانی OYDV و سایر جدایه‌هـای ایـن ویـروس در بانـک ژن، قابل مشاهده است که با استفاده از نـرم‌افـزار SDT v.1.2 در سـطح نوکلئوتیدی رسم شد (شکل ۳).

جهت بررسی وقوع نوترکیبی در ناحیه CI ژنومی در جدایـه‌هـای ایرانی از نرم‌افزار RDP4 استفاده شد. نتایج نشان دهنده عـدم وجـود هر گونه نوترکیبی در این ناحیه بود. همچنین در بررسی سـایر جدایـه های دنیا نیز هیچ گونه نوترکیبی در ناحیه CI مشاهده نشد.

در این پژوهش، وجود ویروس OYDV از برخی منـاطق کاشـت سیر در کشور مورد بررسی قـرار گرفـت و بـرای اولـین بـار در ایـران خصوصـیات مولکـولی ویـروس بـر پایـه ژن CI تعیـین و جایگـاه فیلوژنتیکی جدایه‌های ایرانی در میان سایر جدایه‌های موجود در بانک ژن مشخص شد. بر اساس نتایج بدسـت آمـده، OYDV بـه عنـوان بیمارگر غالب در میزبان سیر مشاهده شد کـه در اکثـر منـاطق مـورد نمونه‌برداری از شیوع بالایی برخوردار است. در نتیجه از یـک سـو بـا توجه به اینکه ایران به عنوان یکی از تولیدکنندگان مهم این محصول در جهان شناخته می‌شود و از سوی دیگر با توجه به اهمیـت سـیر در صنایع غذایی، دارویی و پزشکی، تعیین خصوصیات مولکولی ویـروس های آن به عنوان یک بیمارگر مهم با خسارت بالا، به منظـور تعیـین یک برنامه کنترل کارآمد دارای اهمیت زیادی می‌باشد.

منابع

1. Abdel Wahab A.S., Elnagar S., and El-Sheikh M.A.K. 2009. Incidence of aphid-borne *Onion yellow dwarf virus* (OYDV) in *Alliaceae* crops and associated weeds in Egypt. The 4th Conference on Recent Technologies in Agriculture, 3-5 Nov. 2009. Available at https://www.researchgate.net/publication/274732854.
2. Adams M.J., Antoniw J.F., and Beaudoin F. 2005. Overview and analysis of the polyprotein cleavage sites in the family *Potyviridae*. Molecular Plant Pathology 6: 471–487.
3. Baghalian K., Kim O.K., and Natzuaki K.T. 2010. Molecular variability and genetic structure of the population of *Onion yellow dwarf virus* infecting garlic in Iran. Virus Genes 41: 282–291.
4. Bos L. 1983. Viruses and virus diseases of Allium species. Acta Horticulturae 127:11–29.
5. Fairman-Williams M.E., Guenther U., and Jankowsky E. 2010. SF1 and SF2 helicases: Family matters. Current Opinion in Structural Biology 20: 313-324.
6. Gawande S.J., Chimote K.P., Gurav V.S., and Gopal J. 2013. Distribution and natural incidence of *Onion yellow dwarf virus* (OYDV) on garlic and its related Allium species in India. Indian Journal of Horticulture 70(4): 544-548.
7. Ha C., Coombs S., Revill P.A., Harding R.M., Vu M., and Dale J.L. 2008. Design and application of two novel degenerate primer pairs for the detection and complete genomic characterization of potyviruses. Archives of Virology 153: 25-36.
8. Henderson W.J. 1935. Yellow Dwarf, a Virus Disease of Onions, and Its Control. Bulletin of the Agricultural Experiment Station of the Iowa State College of Agriculture and Mechanic arts 188: 209-255.
9. Koch M., and Salomon R. 1994. Serological detection of Onion yellow dwarf virus in garlic. Plant disease 78: 785-788.
10. Lunello P., Ducasse D., and Conci V. 2005. Improved PCR detection of potyviruses in Allium species. European Journal of Plant Pathology 112: 371–378.
11. Manglli A., Mohammed H.S., Ali E.L., Hussein A., Agosteo G.E., Albanese G., and Tomassoli L. 2014. Molecular analysis of the 3′ terminal region of Onion yellow dwarf virus from onion in southern Italy. Phytopathologia

Mediterranea 53(3): 258.
12. Melhus I.E., Reddy C.S., Henderson W.J., and Vestal E.F. 1929. A new virus disease epidemic on onions. Phytopath 19: 73-77.
13. Nam M., Lee Y.H., Park C.H.Y., Lee M.L., Bae Y.S., Lim S., Lee J.H., Moon J.S., and Lee S.H. 2015. Development of Multiplex RT-PCR for Simultaneous Detection of Garlic Viruses and the Incidence of Garlic Viral Disease in Garlic Genetic Resources. Plant Pathology Journal 31(1): 90-96.
14. Raco M. 2016. Elimination of viruses in garlic (*Allium sativum* L.) by different methods. Bachelor thesis 9-53.
15. Sevik M.A. 2018. Detection of Viruses in Onion Production Areas in Samsun, Turkey. Journal of Scientific and Engineering Research 5(4): 101-104.
16. Shahraeen N., Lesemann D.E., and Ghotbi T. 2008. Survey for viruses infecting onion, garlic and leek crops in Iran. OEPP/EPPO Bulletin 38: 131–135.
17. Soliman A.M., Mahmoud S.Y.M., and Dawood R.A. 2012. Molecular characterization of *Onion yellow dwarf virus* (garlic isolate) with production of virus-free plantlets. International Journal of Virology 8(1): 61-70.
18. Sorel M., Garcia J.A., and German-Retana S. 2014. The Potyviridae cylindrical inclusion helicase: a key multipartner and multifunctional protein. Molecular Plant-Microbe Interactions 27(3): 215–226.
19. Tsuneyoshi T., Matsumi T., Natsuaki K.T. and Sumi S. 1998. Nucleotide sequence analysis of virus isolates indicates the presence of three Potyvirus species in Allium plants. Archives of Virology 143: 97–113.
20. Valli A., Garcia J.A., and Lopez-Moya J.J. 2015. *Potyviridae*. Virology 1-10.
21. Van Dijk P. 1993. Survey and characterization of potyviruses and their strains of Allium species. Netherlands Journal of Plant Pathology 99: 1-48.
22. Verma R.K., Mishra R., Petrov N.M., Stoyanova M., Stoev A., Bakardjieva N.V., and Gaur R.K. 2015. Molecular characterization and recombination analysis of an Indian isolate of Onion yellow dwarf virus. European Journal of Plant Pathology 143: 437–445.
23. "Virus Taxonomy: 2019 Release" *talk.ictvonline.org*. International Committee on Taxonomy of Viruses. Retrieved 30 April 2020.

Journal of Plant Protection
Vol. 34, No. 4, Winter 2021, P. 401-411

نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۴، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۹، ص. ۴۱۱-۴۰۱

Identification and Molecular Characterization of *Onion yellow dwarf virus* Isolates in some Garlic Growing Areas of Iran

A. Entezari[1]- M. Mehrvar[2]*- M. Zakiaghl[3]
Received: 11-05-2020
Accepted: 02-08-2020

Introduction: Garlic (*Allium sativum* L.) is one of the medicinal and economically important crop plants belongings to the Amaryllidaceae and is well known for its worldwide applications. It is widely used as a vegetable. In Iran despite the agricultural potential, we are still facing a garlic shortage in the market, mainly due to the high prevalence of plant diseases particularly viral infections. Most garlic plants are infected by several viruses belonging to different taxonomic groups known as "garlic viral complex". However, *Onion yellow dwarf virus* (OYDV) acts as a major element of this complex. This virus is an important and damaging potyvirus in garlic which causes mild chlorotic to bright yellow stripes on infected leaves. OYDV survives in bulbs and sets and therefore can be transmitted during vegetative reproduction. Also, the green peach aphid, *Myzus persicae*, as well as other aphids, spreads the virus from plant to plant in a nonpersistent manner. OYDV, RT-PCR technique is an effective analytical tool for this purpose. In Iran, for the first time, Shahraeen et al. (2008) were reported OYDV by the serological method in garlic. Afterward, Baghalian et al. (2010), studied the molecular structure of Iranian OYDV based on the coat protein gene analysis. The current study was intended to investigate the partial spreading, genetic diversity and phylogenetic analysis of the different OYDV isolates from garlic and comparing them with other sources of OYDV isolates available in the GenBank. In this study, we present for the first time the genome sequence of Iranian isolates of OYDV based on the CI gene. Besides, the recombination pattern of the CI gene in Iranian isolates was analyzed.

Materials and Methods: During two consecutive growing seasons of 2016-2017 and 2017-2018, a survey was conducted in some of the major areas under the cultivation of garlic in Iran (Khorasan Razavi: Mashhad, Golbahar and kadcan, Mazandaran: Sari and Babolsar, Kerman: Jiroft, Lorestan: Aleshtar and Khuzestan: Shoshtar). Leave samples with yellow striping; crinkling; dwarfing and mosaic symptoms were collected and taken to the laboratory for both sap (mechanical) and molecular tests (RT-PCR/PCR), to identify the disease cause. Total RNA was extracted from the symptomatic leaf samples using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germany) and used for the reverse transcription (RT-PCR) test. Primary detection was done by RT-PCR using degenerate primer pairs (CIF/R). After performing PCR, products with 700 bp length, separated by electrophoresis in 1% agarose gel extracted and purified with the Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany). Then PCR products were cloned in pTG19-T Vector (Vivantis, Malaysia). The recombinant plasmids were extracted using the plasmid DNA isolation kit (Denazist, Iran) followed by sequencing (Macrogene, South Korea). Nucleotide sequence data were analyzed using Clustal Omega, MEGA 6, and RDP 4 software.

Results and Discussion: Among Iranian OYDV garlic isolates which detected in this study, seven isolates from Golbahar, kadcan, Sari, Jiroft, Aleshtar and Shoshtar with severe mosaic symptom and dwarfing were selected for sequencing and determination of their molecular and biological characteristics. Comparative analyses of the partial CI gene sequences showed that seven Iranian isolates shared 75.04-99.86% and 90.22-100% sequence identities at the nucleotide and amino acid level respectively, with different OYDV isolates available in the GenBank. Phylogenetic tree based on partial CI gene placed Iranian OYDV isolates in two varying evolutionary groups; I and II. Group, I consisted of OYDV isolates from Argentina (KF632714/KF632715), Japan (AB219833/AB219834), Australia (HQ258894/JN127342), China (AJ510223), Spain (JX429964), India (KJ451436) alongside Iranian isolates. This group is geographically heterogeneous. All these isolates in group I are isolated from the garlic host. Three Iranian isolates, IR-Kh1, IR-Kh2, and IR-Kh16, which isolated from garlic placed in subgroup I-II, along with isolates from Spain (JX429964), Australia (HQ258894), and India (KJ451436). It indicates the high degree of genetic relationship among Iranian isolates in this subgroup. However, group II, which is also divided into two subgroups, includes four Iranian garlic isolates, IR-Kh33, IR-Kh54, IR-Kh23, and IR-Kh48, and are closely related to the German (JX433020) and Argentine (JX433019) onion isolates. Recombination analysis among Iranian and other isolates in the CI gene showed that there was no recombination in this part of the genome.

1, 2 and 3- Ph.D. Student of Plant Pathology and Associate Professors, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, respectively.
(*- Corresponding Author Email: mehrvar@um.ac.ir)
DOI: 10.22067/jpp.v34i4.86685

Conclusion: Based on the results of this study, the presence of OYDV isolates from some garlic areas of Iran was confirmed and for the first time, the molecular characteristics of the virus based on CI gene were determined. Results showed that OYDV is a dominant pathogen in the garlic field, which is highly prevalent in most sampled areas. Considering the importance of garlic in the food, pharmaceutical, and medical industries, determining the molecular characteristics of its viruses is highly important to determine an efficient control program.

Keywords: Garlic, Iran, *Onion yellow dwarf virus*, Phylogenetic analysis